



# **FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY**

## **Priority Certificate of Filing of a Patent Application**

**Application Number:** 100 15 797.1

**Date of Filing:** 28 March 2000

**Applicant/Owner:** Felix Hausch and Andres Jäschke,  
Berlin/DE

**Title:** Multiplex Analysis of DNA Mixtures Using  
Photolytically Readable DNA Chips

**IPC:** C 12 Q, C 07 H, G 01 N

**The accompanying pages are a proper and exact reproduction of  
the original documentation of this patent application.**

Munich, 22 March 2001

**German Patent and Trademark Office**

Signing for the President of the German Patent Office

Jerofsky



# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 15 797.1

**Anmeldetag:** 26. März 2000

**Anmelder/Inhaber:** Felix Hausch und Dr. Andres Jäschke,  
Berlin/DE.

**Bezeichnung:** Multiplex-Analyse von DNA-Gemischen mittels photo-  
lytisch ablesbarer DNA-Chips

**IPC:** C 12 Q, C 07 H, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. März 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Jerofsky



~~BELEGZUSCHRIEB~~

Darf nicht geändert werden

5

## Multiplex-Analyse von DNA-Gemischen mittels photolytisch ablesbarer DNA-Chips

### Beschreibung:

Die vorliegende Erfindung beinhaltet die Analyse von komplexen Nukleinsäuregemischen in einem einzigen Reaktionsschritt. Dies geschieht durch sequenzspezifische Modifizierung eines Arrays aus photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden. Diese können anschließend mit einem Laserstrahl abgelesen und massenspektroskopisch ausgewertet werden.

### Stand der Technik:

Mit der ständig steigenden Sequenzinformation aus den verschiedenen Sequenzierungsprojekten und der wachsenden Anzahl vollständig bekannter Genome verlagern sich genetische Untersuchungen zunehmend auf reproduzierende oder sekundäre Sequenzanalysen, die auf bekannten Sequenzen aufbauen. Zur Zeit sind die Genome von über 25 Organismen vollständig bekannt, das menschliche Genom und viele weitere werden in den nächsten Jahren hinzukommen. Die dabei gewonnenen Informationen lassen sich vielfach direkt zur Analyse bestimmter Merkmale ausnutzen, z.B. zum Nachweis von Sequenzen, die für Krankheitserreger spezifisch sind. Genetisch bedingte oder prä-dispositionierte Krankheiten können oft auf spezifisch mutierte Genabschnitte zurückgeführt werden. So kennt die Humanmedizin schon heute weit über 3000 monogene Krankheiten, die durch Veränderung einzelner Gene ausgelöst werden. Z.T. kann ein pathogenes Merkmal auf die Mutation eines einzigen Nukleotides zurückgeführt werden. Im Zuge des Human-Genom-Projektes (HUGO) wird diese Zahl weiter wachsen und durch multigenetische Faktoren erweitert werden.

Die wachsende Zahl an relevanten Genmarkern setzt neue Anforderungen an die Diagnostik von Nukleinsäuren. Die klassische Sequenzierung nach der Sanger-Methode, die bei der ursprünglichen Sequenzierung der bisher bekannten Genome angewendet wurde, ist hierbei ungeeignet, da sie zeitaufwendig und nicht vollständig automatisierbar ist.

Mit der Entwicklung von schonenden Massenspektroskopie-Methoden, die eine Analyse von großen, intakten Biomolekülen erlauben, bietet sich hier eine vielversprechende Alternative. So kann durch MALDI-TOF-Massenspektroskopie (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) direkt das Molekulargewicht von Nukleinsäuren bestimmt werden (Hillenkamp und Karas, 1990, Methods in Enzymol., 280). Im Gegensatz zur klassischen Sanger-Sequenzierung durch PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wird dabei die Sequenz-spezifische Fragment-Leiter einer DNA-Probe mit einer einzigen

25.10.00 67

Massenbestimmung ermittelt. Diese Technik wurde bereits erfolgreich zur Sequenzierung des menschlichen p53-gens eingesetzt (Fu et al., 1998, Nat. Biotechnol., 381), eine entsprechende Vorrichtung hierfür ist in US 96/710565 (F. Hillenkamp, 1996) vorgeschlagen. Durch Verbesserung der Messbedingungen (schonendere Anregung im IR-Bereich, neutrale Matrix) ist es in letzter Zeit möglich geworden, weit größere DNA-Moleküle mit über 2500 Nukleotiden zu vermessen (Berkenkamp et al., 1998, Science, 260). Dadurch sollte sich der Leserahmen sowie die Messgenauigkeit bei der massenspektroskopischen Sequenzierung deutlich verbessern (PCT/US99/10251, WO 99/57318). In dieser Hinsicht sind auch die Verwendung von stabileren oder isotopenreinen Nukleotidanaloga zu erwähnen (PCT/GB 96/00476, WO 96/27681, I. Gut et al.). Ein Verfahren zur genaueren massenspektroskopischen DNA-Sequenzierung durch internes Kalibrieren ist in PCT/BG 94/02527 (WO 95/14108, M. A. Reeve et al) vorgeschlagen.

Die Diagnostik bereits bekannter Gene ist durch die Entwicklung sogenannter DNA-Chips erheblich vereinfacht worden (Gerhold et al., 1999, Trends In Biochemical Sciences, 168-73). Dabei sind Oberflächen mit Oligonukleotiden funktionalisiert, die zu dem zu untersuchenden genetischen Material komplementär sind. In der Regel sind die Oligonukleotid-Marker in einem Array-Format angeordnet, so dass durch die Hybridisierung an einer bestimmten Position auf die Präsenz der entsprechenden Sequenz innerhalb der biologischen Probe geschlossen werden kann (Fodor, 1997, Science, 393-395). Die Auswertung der Hybridisierungstests erfolgt in der Regel über Fluoreszenzmarkierung der Proben und ein Scannen des DNA-Chips. Der große Vorteil der DNA-Analyse mittels DNA-Chips ist der hohe Durchsatz: So können auf einem 1,6x1,6cm Chip bis zu 137.000 Oligonukleotide platziert und innerhalb von 10 Minuten abgelesen werden (Chee et al., 1996, Science, 610-614). Die Fluoreszenz-Analyse der hybridisierten Proben erlaubt jedoch keinen weiteren Informationsgewinn über die Zielsequenz, zudem ist die Hybridisierungseffizienz abhängig von der jeweiligen Basenzusammensetzung und wird auch maßgeblich von Sekundärstrukturen beeinflusst, so dass in der Regel nur relative Aussagen gegenüber internen Referenzen möglich sind. Außerdem werden einzelne Fehlpaarungen toleriert, die nur durch umfangreiche Kontrollexperimente ausgeschlossen werden können.

Die massenspektroskopische Auswertung von DNA-Chips bietet generell den Vorteil, daß sie neben der Präsenz der untersuchten Nukleinsäure zusätzliche Information durch das Molekulargewicht liefert. Diese „dritte“ Dimension der Messung (neben der zweidimensionalen Position auf dem Chip) kann zur internen Kontrolle der hybridisierten DNA-Proben herangezogen werden. Auch bei der massenspektroskopischen Sequenzierung

von DNA wurde dies bereits zur zusätzlichen Kontrolle der gemessenen Nukleinsäurefragmente und zur Interpretation der beobachteten Sequenzierleiter ausgenutzt (Kirpekar et al., 1998, Nucleic Acids Res., 2554-2559).

Da bei MALDI-TOF-Messungen die Nukleinsäure-Fragmente auf einer flachen Oberfläche präsentiert werden, eignet sich diese Methode besonders gut zur schnellen Auswertung von Nukleinsäure-Chips. Die zu untersuchenden Nukleinsäuren werden zunächst in einer festen, organischen Matrix eingeschlossen, welche anschließend durch Laserbeschuss von der Oberfläche desorbiert werden. Dabei werden isolierte Nukleinsäuren als Matrixcluster mit in die Gasphasen gerissen, von der sich ablösenden organischen Phase ionisiert und anschließend anhand der charakteristischen Flugzeit im elektrischen Feld nachgewiesen. Durch die Anregung mit einem Laser lassen sich gezielt einzelne Punkte innerhalb des DNA-Arrays auswerten. Ein solches Konzept ist in PCT/US 94/00193 (WO 94/16101, H. Köster) beschrieben, bei dem die zu untersuchenden Proben auf einer geeigneten Oberfläche immobilisiert werden und anschließend mit einem Oligonukleotid-Marker inkubiert werden. Diese Sonden werden ggf. sequenz-spezifisch modifiziert, bevor sie MALDI-TOF-massenspektroskopisch nachgewiesen werden. Dies setzt eine separate Aufreinigung und gezielte Platzierung für jede der zu untersuchenden DNA-Proben voraus. Bei der Menge der zu untersuchenden Proben – z.B. alle relevanten, bisher bekannten 3000 Punktmutationen – ist dies mit erheblichem Aufwand verbunden. Es wurden daher Nukleinsäure-Modifikationen vorgeschlagen, die eine kovalente Immobilisierung der Proben auf dem Chip erleichtern (O'Donnell et al., 1998, PCT/US97/20195, WO 98/20020). Als zusätzliche Modifikation wurden auch photospaltbare Bausteine für MALDI-TOF-Messungen beschrieben (Olejnik et al., 1998, Nucleic Acids Res., 3572-3576), die eine lichtgesteuerte Freisetzung der Proben erlaubt. Ähnlich wurde die Verwendung von Photospaltstellen in (Koster et al., 1998, PCT/US97/20444, WO 98/20166) vorgeschlagen, um die Nachweisreaktionen für jede Probe einzeln durchzuführen und diese Reaktionsansätze in einem Arrayformat auf einen MALDI-TOF-geeigneten Chip zu spotten. Dabei erlaubt eine funktionelle Gruppe der Nukleinsäure-Sonden die spezifische Aufreinigung an einer speziell präparierten Oberfläche und die Photospaltstelle anschließend eine photolytische Freisetzung zur MALDI-TOF-Detektion.

Der Einsatz von spaltbaren Primern als DNA-Sonden zur massenspektroskopischen Sequenzierung ist ferner in PCT/US 96/06116 (WO 96/37630, J. A. Monforte et al.) vorgeschlagen worden, wobei dies zur Verkürzung der zu messenden Nukleinsäure-Fragmente und damit zu einem verbesserten Leserahmen führen sollte. Der Einsatz von immobilisierten Primern in einer Zweischritt-Amplifikation ist in DE 19710166 (Gut, I und

Franzen, J.; 1998) beschrieben zu dem Zweck, die hochparallele Bearbeitung von Nukleinsäuren an magnetischen Partikeln zu beschleunigen und ggf. zu automatisieren.

Kovalent immobilisierte Oligonukleotid-Sonden bieten generell den Vorteil der verbesserten und einfacheren Handhabung. So sind verschiedenste Reaktionsbedingungen wie z.B. denaturierendes Waschen oder Temperatursprünge möglich, die insbesondere bei enzymatischen Reaktionen an fester Phase notwendig werden. Kovalent immobilisierte Sonden sind jedoch nicht für eine MALDI-TOF-Analyse zugänglich, da sie nicht von der Oberfläche desorbieren können.

Der Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung bietet die einzigartige Möglichkeit, gemäß der Watson-Crick-Basenpaarungsregel komplementäre Oligonukleotid-Sonden für jede beliebige Zielsequenz zu generieren. Zumindest aus biologischer Sicht ist diese Interaktion jedoch relativ unspezifisch. So werden einzelne Fehlpaarungen toleriert oder können durch Nebeneffekte wie außergewöhnlich stabile Sekundär-Strukturen, hoher G/C-Anteil etc. überlagert werden. Gerade beim Sequenzieren oder bei dem Nachweis von Mutationen einzelner, entscheidender Nukleotide (SNP) ist jedoch eine reproduzierbare und verlässliche Auflösung einzelner Basen entscheidend. Enzymatische Transformationen sind hier der einfachen Hybridisierung eindeutig überlegen. So schneiden Restriktionsenzyme nur die jeweilige Erkennungs-Sequenz an einer definierten Position abhängig vom Methylierungsmuster. Endonukleasen hydrolysieren bevorzugt einzelne Nukleotide und DNA-Ligasen sind extrem sensitiv für perfekte Basenpaarung an der Ligationsstelle. DNA-Polymerasen besitzen oft eine zusätzliche Proof-Reading-Aktivität, mit der sie eigene Fehler korrigieren. Dieses Prinzip wird bei klassischen DNA-Nachweisverfahren wie der Polymerasekettenreaktion (PCR), Ligasekettenreaktion (LCR), dem RNA-footprinting oder der Sanger-Sequenzierung angewendet.

Auch für den Nachweis von immobilisierten Nukleinsäuren wurden enzymatische Modifikationen zur spezifischen Detektion einzelner Nukleotide vorgeschlagen (GB 2308188, Minter, S. J., 1997). In (Koster et al., 1998, PCT/US97/20444, WO 98/20166) erfolgt die Detektion der modifizierten Oligonukleotid-Sonden durch Massenspektroskopie. In beiden Fällen ist dabei die zu untersuchende Zielsequenz an der festen Phase immobilisiert, so dass diese vor jedem Nachweis auf die Oberfläche aufgebracht werden muss. Wird die Oligonukleotid-Sonde immobilisiert, so geschieht dies nach der Modifikation zur einfacheren Aufreinigung.

Mit zunehmender Kenntnis der genetischen Faktoren, die für bestimmte Veranlagungen, Krankheiten oder für ein gesundheitliches Risiko verantwortlich sind, wächst die Zahl der

relevanten Nukleotide, die innerhalb einer biologischen Probe zu überprüfen sind. Bei enzymatischen Nachweisen setzt dies klassisch eine Reaktion und Detektion pro Zielsequenz voraus. Selbst bei Automatisierung und paralleler Probenbearbeitung mit extrem hohem Durchsatz führt dies zu erheblichem präparativen Aufwand.

Durch kombinatorische Manipulationen lassen sich viele analoge Reaktionen in einem einzigen Reaktionsschritt durchführen. So werden bei der Multiplex-PCR durch Zugabe mehrerer Primerpaare verschiedene DNA-Segmente aus einer biologischen Probe gleichzeitig in einem einzigen PCR-Ansatz amplifiziert. In einem solchen Ansatz verlagert sich das Detektionsproblem in der Regel auf die Dekonvolution des komplexen Sequenzgemisches.

Um die Anreicherung von unerwünschten Nukleinsäuren insbesondere bei der Untersuchung von stark unterrepräsentierten Sequenzen zu unterdrücken, bietet sich das Verfahren der nested PCR an. Dabei wird in einer Zwei-Schritt-Amplifikation unter Verwendung von zwei ineinander geschachtelten Primerpaaren die Spezifität verdoppelt.

#### **Aufgabe der Erfindung:**

Durch die vorliegende Erfindung sollen der hochparallele Proben-Durchsatz von Oligonukleotid-Chips, die Nachweis-Spezifität von templat-abhängigen Modifikationen sowie der hohe Informationsgewinn einer massenspektroskopischen Detektion in einer Multiplex-Analyse mit Hilfe von photolytisch ablesbaren Oligonukleotid-Sonden kombiniert werden.

#### **Problemlösung durch die Erfindung:**

Es ist der Grundgedanke der Erfindung, die multiplexen Nachweisreaktionen direkt auf dem DNA-Chip durchzuführen, wobei durch die definierte Positionierung der Oligonukleotid-Sonden gleichzeitig das komplexe Zielsequenz-Gemisch räumlich aufgetrennt wird. Zur Erhöhung der Spezifität soll der Nachweis durch enzymatische Modifikation der Oligonukleotid-Sonden in Abhängigkeit von den jeweiligen Zielsequenzen erfolgen. Eine kovalente Immobilisierung der Oligonukleotid-Sonden ermöglicht dabei die notwendigen Reaktionsbedingungen, insbesondere Temperatursprünge zur Hybridisierung der Zielsequenzen, denaturierende Lösungsmittel zur effizienten Abtrennung von kontaminierenden Nukleinsäurespuren und eines extremen pHs während der Aufnahme in einer MALDI-TOF-Matrix. Die Detektion erfolgt wegen des zusätzlichen Informationsgewinns bevorzugt durch Massenspektroskopie - insbesondere mit MALDI-TOF-MS -, was durch eine Photospaltstelle der Oligonukleotid-Sonden ermöglicht wird.





Einheiten, insbesondere, 1-o-Nitrophenyl-1,3-propan-diphosphate Ausgewählte Vertreter von photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden sind in Figur 3 dargestellt.

Andererseits können die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden direkt auf der Oberfläche synthetisiert werden, entsprechende Vorschriften sind in der Fachliteratur beschrieben. Bei beiden Herstellungsverfahren kann die Photospaltstelle alternativ als eine flächendeckende Schicht auf den festen Träger aufgebracht werden, der dann an den entsprechenden Positionen mit weitergehend mit den gewünschten Oligonukleotiden beladen bzw. synthetisiert wird.

Unter der templat-gesteuerten Modifikation der Oligonukleotid-Sonden ist ihre enzymatische Veränderung gemäß einer hybridisierten Zielsequenz zu verstehen, wobei diese Veränderung nachträglich Auskunft über die Nukleotid-Zusammensetzung der Zielsequenz gibt. Es ist dabei ein Teil der Erfindung, dass die enzymatische Modifikation durch templat-abhängige Primerverlängerung der Oligonukleotid-Sonden realisiert wird. Dies schließt explizit eine Punktmutationsanalyse oder eine Kettenabbruchs-Sequenzierung mit Didesoxynukleotid-Triphosphaten ein.

Es ist ferner ein Grundgedanke der Erfindung, den enzymatischen Nachweis durch templat-abhängige DNA-Ligation zu verwirklichen, wobei die zu ligierenden Reporter-Oligonukleotide als kombinatorische Mischung zu der Nachweisreaktion zugegeben werden. Unter Reporter-Oligonukleotide sind 5-100 Nukleotide lang – bevorzugt 20-25 Nukleotide lange – Nukleinsäuren bevorzugt aus DNA, RNA, PNA oder deren Derivate zu verstehen, die zu einem den immobilisierten Oligonukleotid-Sonden benachbarten Abschnitt auf der jeweiligen Zielsequenz komplementär sind. Nur bei perfekter Basenpaarung an der Schnittstelle von Oligonukleotide-Sonden und -Reporter erfolgt die Ligation, sodass durch dieses Ereignis die Basenzusammensetzung der Zielsequenz an der Schnittstelle bestimmt werden kann. Es ist im Sinne der Erfindung, dass durch die zusätzliche Hybridisierung der Reporter-Oligonukleotide die Sequenzspezifität des Nachweises erhöht wird und dass so insbesondere auch Insertions- und Deletions-Mutanten nachgewiesen werden können. Es ist ein weiterführender Gedanke der Erfindung, dass die Reporter-Oligonukleotide eine zusätzliche Erkennungsgruppe tragen, die eine vereinfachte oder alternative Detektion erlauben. Dies schließt insbesondere Massen-, Fluoreszenz- oder Affinitätsmarker bzw. eine weitere lichtempfindliche Gruppe ein. Die Reporter-Oligonukleotide können zusätzlich stabilisierte oder neutralisierte Nukleotide zur effizienteren massenspektroskopischen Detektion enthalten.

Es ist ferner ein Grundgedanke der Erfindung, die Zusammensetzung der Zielsequenz durch templat-abhängige Nukleotid-Spaltung der photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden zu

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 104

bestimmen. Dies schließt insbesondere einen templat-abhängigen Restriktionsverdau ein, mit dem bevorzugt das Methylierungsmuster der Zielsequenzen ermittelt werden kann. Dabei wird bevorzugt ein kombinatorisches Gemisch aus verschiedenen Restriktionsenzymen verwendet.

Die Erfindung bezieht sich auch auf Endonukleasen, die nur bei perfekter Basenpaarung oder bei partieller Fehlpaarung spalten. Eine bevorzugte Ausführung beinhaltet Oligonukleotid-Sonden mit einem einzelnen, internen Ribonukleotid, das nur bei perfekter Paarung mit dem zu untersuchenden DNA-Gegenstrang z.B. durch RNase H hydrolysiert wird.

Es ist eine bevorzugte Ausführung der Erfindung, ein Set von relevanten – bevorzugt aller – Punkt-, Insertions-, oder Deletions-Mutationen eines Patienten in einem einzigen Reaktionsschritt zu überprüfen. Dies umfasst insbesondere eine vorbereitende Vervielfältigung der relevanten Sequenzabschnitte durch multiplexe PCR mit äußeren Primerpaaren, eine Multiplex-Analyse durch Ligation von Reporter-Oligonukleotiden an photospaltbare Sonden sowie ein photolytisches Ablesen der Ligationsprodukte mit anschließender MALDI-TOF-Detektion. Oligonukleotid-Reporter und –Sonden liegen dabei explizit innerhalb des von den äußeren Primern eingeschlossenen Sequenzbereiches.

Eine weitere bevorzugte Ausführung der Erfindung besteht im multiplexen Resequenzieren bereits bekannter Genome zur Ermittlung von klinisch relevanten Mutationen.

### Beschreibung der Figuren:

Figur 1 stellt ein Ensemble von Zielsequenzen dar, die an den jeweiligen Positionen an die entsprechend komplementären Oligonukleotid-Sonden  $P_{1-n}$  hybridisieren.  $X_{1-n}$  symbolisieren die Nukleotide, die in der Multiplex-Analyse auf relevante Mutationen hin überprüft werden sollen.  $A_{1-n}$  und  $Z_{1-n}$  repräsentieren benachbarte Sequenzabschnitte, die zur Positionierung auf dem Oligonukleotid-Chip bzw. für die enzymatischen Nachweisreaktionen herangezogen werden. Das große Parallelogramm repräsentiert die Oberfläche des Chips, auf dem die Oligonukleotid-Sonden über die als Wellenlinie dargestellten Spacer kovalent immobilisiert sind. Die schwarzen Kreise entsprechen Photospaltstellen, die eine zielgerichtete Freisetzung durch Laserbestrahlung bei gleichzeitiger Detektion der modifizierten Oligonukleotid-Sonden durch MALDI-TOF-Massenspektroskopie erlauben.

Figur 2 zeigt zwei Methoden zum enzymatischen Nachweis durch templat-abhängigen Modifikation der photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden. a) Der Sequenzabschnitt  $Z_n$  einer

exemplarischen Zielsequenz hybridisiert an die komplementäre Oligonukleotid-Sonde  $P_n$ , die über einen als Wellenlinie dargestellten photospaltbaren Linker auf der festen Oberfläche (als Kugel dargestellt) kovalent immobilisiert ist. Anschließend wird diese gemäß des zu überprüfenden Nukleotides  $X_n$  durch eine DNA-Polymerase um das komplementäre Didesoxynukleotid  $Y_n$  verlängert. Die modifizierte Oligonukleotid-Sonde  $Y_nP_n$  wird anschließend durch photolytisch Spaltung der Photospaltstelle (schwarzer Kreis) freigesetzt und MALDI-TOF-massenspektroskopisch vermessen.

b) Insertions-, Deletions- oder Punkt-Mutations-Analyse durch templat-abhängige DNA-Ligation: Der Sequenzabschnitt  $X_nZ_n$  einer Zielsequenz lagert sich an die immobilisierte Oligonukleotid-Sonde  $Y_nP_n$  an, während das Reporter-Oligonukleotid  $B_n$  an den benachbarten Sequenzabschnitt  $A_n$  hybridisiert. Entspricht das zu überprüfende Zielnukleotid  $X_n$  nicht dem Sondeterminus  $Y_n$ , so kann keine Ligation stattfinden, gleiches gilt, wenn  $X_n$  eliminiert ist. Insertions-Mutanten, bei denen  $X_n$  ein zusätzliches Nukleotid darstellt, können ebenso durch Ligation von  $Y_nP_n$ -Oligonukleotid-Sonden identifiziert werden.

In Figur 3 sind exemplarisch zwei potentielle photospaltbare Oligonukleotid-Sonden dargestellt. Beide enthalten jeweils einen 19 Nukleotide langen DNA-Teil für den enzymatischen Nachweis durch templat-abhängige Modifikation und eine o-Nitrobenzyl-Einheit zur gezielten Photospaltung. Diese ist von flexiblen Hexa- bzw. Polyethylenglykol-Spacern eingefasst, die eine ungehinderte Zugänglichkeit für hybridisierende Zielsequenzen oder modifizierende Enzyme gewährleisten. Beide Oligonukleotid-Sonden enthalten ferner eine funktionelle Gruppe, die eine Immobilisierung auf einem Festphasenträger ermöglichen:

a) Anthracen als Dien in einer Diels-Alder-Reaktion mit geeigneten Dienophilen, z.B. Maleimid. b) eine primäre Amino-Gruppe zur Reaktion mit geeigneten Aktiv-Estern, z.B. NHS-Ester. In c) ist ein o-Nitrobenzyl-Phosphoramidit gezeigt, das zur Generierung der Photospaltstelle innerhalb der photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden verwendet werden kann.

Figur 4a) zeigt in die MALDI-TOF-massenspektroskopische Analyse der photospaltbaren Oligonukleotid-Sonde aus Figur 3a). Als dominierender Peak bei  $m/z = 6189,9$  ist das Signal des photolytisch freigesetzten Oligonukleotid-Fragmentes zu erkennen (berechnet:  $[M+H]^+ = 6190,0$  g/mol). Nur noch in Spuren ist der Molmassenpeak der unzersetzten Oligonukleotid-Sonde zwischen 7036,2-7300,0 g/mol zu sehen, der wegen des polydispersen Polyethylenglykol-Spacers in mehrere Peaks aufspaltet.

b) Immobilisierung und photolytische Freisetzung von photospaltbaren Nukleinsäure-Konjugaten: Weiße Balken = gelöste Nukleinsäure; schwarze Balken = immobilisierte Nukleinsäure; Bahn 1 = eingesetztes, radioaktiv markiertes, photospaltbares Nukleinsäure-Konjugat; Bahn 2 = immobilisierte Fraktion nach intensivem, denaturierenden Waschen; Bahn 3 = photolytische Freisetzung der immobilisierten Nukleinsäure (schwarzer Balken aus Bahn 2).

### Ausführungsbeispiele:

#### a) Multiplexe Mutationsanalyse

Zunächst werden für jede zu untersuchende Mutationsstelle je zwei äußere Amplifikations-Primer und ein Reporter-Oligonukleotid durch klassische Festphasensynthese synthetisiert, wobei jeweils einer der Amplifikationsprimer 5'-terminal mit Biotin derivatisiert ist.

Zur Herstellung des Array aus photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden wird zunächst eine DMTr-Polyethylenglykol-funktionalisierte Glasoberfläche mit Trichloressigsäure entschützt und dann flächendeckend mit Tetrazol und einer 0,1M Acetonitril-Lösung des in Figur 3c) dargestellten Photo-Phosphoramidit behandelt. Nach wiederholtem Waschen mit Acetonitril werden die nicht reagierte funktionelle Gruppen mit Acetanhydrid, Lutidin und 1-Methylimidazol in THF blockiert, gefolgt von einer Behandlung mit einer 1M Jod-Lösung in Pyridin/THF/Wasser. Auf diese o-Nitrobenzyl-derivatisierte Oberfläche werden durch einen dem Fachmann bekannten Oberflächen-Syntheseroboter an den jeweiligen Positionen die entsprechenden Oligonukleotid-Sequenzen wie in dem in Figur 1 dargestellten Format synthetisiert. Diese werden abschließend flächendeckend durch eine 0,1M Biscyanoethyl-N,N-diisopropyl-phosphoramidit-Lösung (in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) chemisch phosphoryliert. Zur Entschütung der photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden wird der Chip über Nacht bei 55°C mit 33%  $\text{NH}_4\text{OH}$  behandelt.

Aus einer biologischen Probe eines Patienten, z.B. einer Haarwurzel oder einem Blutropfen, wird nach Standardmethoden das genetische Material isoliert. In einem einzigen Reaktionsansatz werden alle Zielsequenzen mit dem Set der äußeren Primerpaare durch Multiplex-PCR vervielfältigt. Über die biotinylierten Primer werden die Amplifikationsprodukte an einer Streptavidin-Agarose-Festphase aufgereinigt. Durch Waschen mit 0,1M Natronlauge werden die Gegenstränge in Lösung gebracht, nach Neutralisation mit einem Set von Reporter- Oligonukleotiden vermischt und dann auf dem Chip aufgetragen (siehe Figur 1). Bei einer Endkonzentration von 20mM Tris/HCl (pH=8,3), 50mM KCl, 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 10mM DTT, 1mM EDTA, 1mM NAD, 0,1% Triton X-100 und

1U Tth DNA Ligase werden die Ligationsreaktionen wie in Figur 2b) dargestellt mit 20 Zyklen à 30 Sekunden bei 95°C, 1 Minute bei 50°C und 5 Minuten bei 70°C durchgeführt. Anschließend wird der Chip wiederholt mit 25% DMSO und 0,2M Ammoniumhydroxid-Lösung gewaschen und abschließend mit einer 1mm dicken Schicht einer 3-Hydroxypicolinsäure-Lösung bedeckt, die zur Trockene eingedampft wird. Mit einem Nd-YAG-Laser werden nun bei  $\lambda=355\text{nm}$  die einzelnen Punkte auf dem Chip nacheinander angeregt und die freigesetzten Oligonukleotid-Sonden (vergl. Figur 4b)) wie in Figur 4a) MALDI-TOF-massenspektrometrisch vermessen. Die Signale werden durch eine integrierte Software auf klinisch relevante Mutationen hin ausgewertet. Alle Teilschritte des Verfahrens sind automatisierbar.

#### b) Multiplexe Resequenzierung an fester Phase

Zur multiplexen Sequenzierung verschiedener Sequenzbereiche einer genetischen Probe wird zunächst ein Set an photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden durch klassische Festphasensynthese synthetisiert. Diese sind so gewählt, dass je eine Sonde im Abstand von 50 Nukleotiden an die Zielsequenz hybridisieren kann, wobei sich die Sonden für Strang und Gegenstrang nicht überschneiden. Die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden sind wie in Figur 3a) aufgebaut, das Anthracen-Polyethylenglykol, der Hexaethylenglykol-Spacer sowie die photospaltbare o-Nitrobenzyl-Einheit werden als entsprechend derivatisierte Phosphoramidite eingebaut. Mit den Stammlösungen dieser Oligonukleotide können nun weit über 10000 multiplexe Sequenzier-Reaktionen der genetischen Zielsequenz durchgeführt werden.

Eine Amino-derivatisierte Oberfläche wird nun gleichmäßig durch Behandlung mit 0,1M Maleinimidylhexanoat-NHS-Ester in DMF flächendeckend funktionalisiert. Auf diese Maleinimid-Oberfläche werden durch einen kommerziell erhältlichen Gen-Spotting-Roboter die Anthracen-funktionalisierten Oligonukleotid-Sonden (Analoge von 3a)) als 10nl-Volumina in einem Arrayformat pipettiert. Dieser in Figur 1 gezeigte Chip wird nach Übernacht-Inkubation durch intensives Waschen von nicht immobilisierten Oligonukleotid-Sonden befreit.

Aus einer biologischen Probe wird nun ein 250.000 Basenpaare enthaltender genetischer Bereich durch Klonierung vervielfältigt und nach Standardmethoden aufgereinigt. Die erhaltene DNA wird auf vier der oben beschriebenen Chips verteilt und mit einer Sequenziermischung (Sequenase, dATP, dGTP, dCTP, dTTP sowie je ein ddNTP) versetzt. Nach 30 Zyklen à 15 Sekunden bei 95°C, 15 Sekunden bei 55°C und 30 Sekunden bei 72°C

BELEGEXEMPLAR

Darf nicht geändert werden

16

wird der Chip wiederholt mit 25% DMSO und 0,2M Ammoniumhydroxid-Lösung gewaschen und abschließend mit einer 1mm dicken Schicht einer 3-Hydroxypicolinsäure-Lösung bedeckt, die zur Trockene eingedampft wird. Mit einem Nd-YAG-Laser werden nun bei  $\lambda=355\text{nm}$  die einzelnen Punkte auf dem Chip nacheinander angeregt und die freigesetzten Oligonukleotid-Sonden (vergl. Figur 4b)) wie in Figur 4a) MALDI-TOF-massenspektrometrisch vermessen. Die gemessenen Sequenzierleitern der jeweiligen Terminator-Nukleotide werden durch eine integrierte Software ausgewertet, wobei die Terminationsprodukte durch die detektierten Massen überprüft und ggf. korrigiert werden. Nach Korrelation der Strang- und Gegenstrang-Ergebnisse wird die erhaltene Gesamt-Sequenz mit bereits bekannten Daten verglichen und so die abweichenden Mutationen ermittelt.

0 25.03.00  
14.12.2014  
Darf nicht geändert werden

14

#### Patent-Ansprüche:

1. Verfahren zur massenspektroskopischen Analyse von Nukleinsäuren mit Hilfe eines räumlich definierten Oligonukleotid-Chip oder -Array **dadurch gekennzeichnet, daß** ein komplexes Gemisch von Sequenzen gleichzeitig und parallel untersucht wird, indem ein Set von photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden zunächst in einem einzigen Reaktionsschritt in einer für die jeweiligen Zielsequenzen charakteristischen Weise modifiziert wird und anschließend durch ortsgerichtete Bestrahlung massenspektroskopisch vermessen werden kann.
2. Verfahren nach Anspruch 1 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Zielsequenzen vor der Analyse in einer Eintopf-Reaktion vervielfältigt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch die kovalente Immobilisierung der Sonden auf einem festen Träger diese nach der Modifizierung durch intensives, ggf. denaturierendes Waschen gereinigt und von störenden Nukleinsäure-Kontaminationen befreit werden können.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch Bestrahlung der Sonden diese nach Modifizierung und Aufreinigung freigesetzt und somit massenspektroskopisch untersucht werden können.
5. Verfahren nach Anspruch 4 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch die Photospaltstelle der Sonden diese in einer räumlich definierten Weise durch Laserbestrahlung angesteuert und vermessen werden können.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5 **dadurch gekennzeichnet, daß** die massenspektroskopische Detektion durch MALDI-TOF erfolgt.
7. Verfahren nach dem Anspruch 6 **dadurch gekennzeichnet, daß** die photolytische Abspaltung der Oligonukleotid-Sonden von der festen Oberfläche gleichzeitig während deren Desorption und Ionisierung stattfindet.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche **dadurch gekennzeichnet, daß** die Sonden auf einer für MALDI-TOF-Massenspektroskopie geeigneten Oberfläche immobilisiert sind, **daß** an dieser Oberfläche die Modifizierung der Sonden stattfindet und **daß** die photolytische Freisetzung während der MALDI-TOF-Messung stattfindet.

9. Verfahren nach Anspruch 1 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Modifizierung der photospaltbaren Sonden durch eine templat-abhängige Primerverlängerung erfolgen kann.

10. Verfahren nach Anspruch 9 **dadurch gekennzeichnet, daß** bei der templat-abhängigen Primerverlängerung der photospaltbaren Sonden mindestens ein Didesoxynukleotid eingesetzt wird

11. Verfahren nach Anspruch 1 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Modifizierung der photospaltbaren Sonden durch eine templat-abhängige Ligation mit geeigneten Reporter-Oligonukleotiden erfolgen kann.

12. Verfahren nach Anspruch 11 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch die Sequenz der Reporter-Oligonukleotide die Templat-Spezifität der Ligation zusätzlich erhöht wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch die zusätzlich Templat-Spezifität der Reporter-Oligonukleotide insbesondere Insertions- und Deletions-Mutations-Analysen möglich sind.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-13 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Reporter-Oligonukleotide eine zusätzliche Erkennungsgruppe tragen können.

15. Verfahren nach Anspruch 14 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Erkennungsgruppe aus einem Massen-, Fluoreszenz-, Affinitäts-Marker oder einer photoaktiven Gruppe besteht.

16. Verfahren nach Ansprüchen 1 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Modifizierung der photospaltbaren Sonden durch eine templat-abhängige, endonukleolytische Spaltung erfolgt.

17. Verfahren nach Anspruch 16 **dadurch gekennzeichnet, daß** die endonukleolytische Spaltung durch Restriktionsenzyme erfolgt.



18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch templat-abhängigen Restriktionsverdau der photospaltbaren Sonden die Methylierungsmuster der Zielsequenzen nachgewiesen werden können.
19. Verfahren nach Anspruch 16 **dadurch gekennzeichnet, daß** die endonukleolytische Spaltung durch Einzelstrang-spezifische Nukleasen erfolgt.
20. Verfahren nach Anspruch 16 oder 19 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch templat-abhängigen Nukleaseverdau der photospaltbaren Sonden einzelsträngige Fehlpaarungen der Hybride aus Sonden und Zielsequenzen identifiziert werden können.
21. Verfahren nach Anspruch 16 **dadurch gekennzeichnet, daß** die endonukleolytische Spaltung durch Doppelstrang-spezifische Nukleasen erfolgt.
22. Verfahren nach Anspruch 21 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Doppelstrang-spezifische Nuklease RNase H ist.
23. Verfahren nach Anspruch 1 **dadurch gekennzeichnet, daß** die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden mindestens ein Ribonukleotid enthalten können.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 21-23 **dadurch gekennzeichnet, daß** nur bei perfekter Basenpaarung die Ribonukleotide der photospaltbaren Sonden templat-abhängig verdaut werden können, wodurch die Fehlpaarung in den photospaltbaren Sonden nachgewiesen werden kann.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-24 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Hybridisierung der Zielsequenzen an die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden und deren templat-abhängige Modifizierung mehrfach hintereinander durchgeführt wird.
26. Verfahren nach Anspruch 25 **dadurch gekennzeichnet, daß** die verwendeten Enzyme thermostabil sind und daß der Nachweis-Reaktionsansatz direkt auf dem Chip wiederholt erwärmt wird.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8 **dadurch gekennzeichnet, daß** der Nukleinsäure-Chip aus einer Oberfläche mit 10-100000 räumlich definierten, photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden besteht.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 4, 5 oder 27 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Photospaltstelle aus einer o-Nitrobenzyleinheit besteht.
29. Verfahren nach Anspruch 27 **dadurch gekennzeichnet, daß** die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden zusätzlich über einen Spacer an die Oberfläche geknüpft sind, dergestalt, daß die enzymatische Modifikation der Sonden erleichtert wird.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 27-29 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Sonden als photospaltbare Oligonukleotid-Konjugate im Array-Format auf der Oberfläche immobilisiert werden.
31. Verfahren nach dem Anspruch 30 **dadurch gekennzeichnet, daß** die photospaltbaren Oligonukleotid-Konjugate zur Immobilisierung ein zusätzliche Funktionalität tragen.
32. Verfahren nach dem Anspruch 31 **dadurch gekennzeichnet, daß** die zusätzliche Funktionalität aus einer Amino-, Schwefelwasserstoff-, Carboxyl-Gruppe, Biotin, Anthracen oder einem Dien besteht.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 27-29 **dadurch gekennzeichnet, daß** die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden direkt auf der Oberfläche synthetisiert werden.
34. Verfahren nach Anspruch 33 **dadurch gekennzeichnet, daß** zunächst einheitlich die Photospaltstellen und ggf. die Spacer synthetisiert werden.
35. Nukleinsäure-Chips mit photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden nach einem der vorangegangenen Ansprüchen 1 oder 27-34

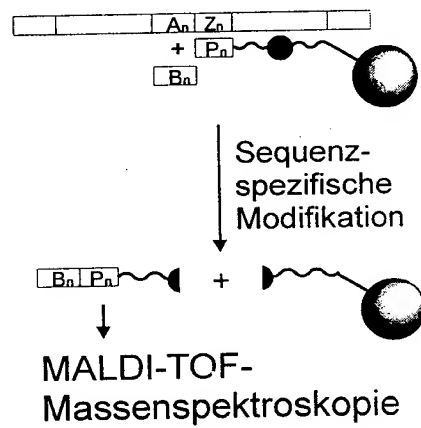
## Multiplex-Analyse von DNA-Gemischen mittels photolytisch ablesbarer DNA-Chips

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die gleichzeitige Analyse von Nukleinsäure-Sequenzen innerhalb eines komplexen Nukleinsäure-Gemisches mit Hilfe von photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden. Diese erlauben hochparallele und dennoch sequenzspezifische Nachweisreaktionen in einem einzigen Reaktionsansatz. Da die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden in einer räumlich definierten Weise – z.B. in Form eines Arrays – auf einer Oberfläche platziert sind, kann jede Position auf dem Oligonukleotid-Chip einer bestimmten Zielsequenz zugeordnet werden. Da die photospaltbaren Sonden kovalent auf der festen Oberfläche immobilisiert sind, kann die Nachweisreaktion direkt auf dem Chip unter Erhalt des Sonden-Positions-Musters durchgeführt werden. Durch einen lichtempfindlichen Baustein innerhalb der Sonden können diese nach der Nachweisreaktion photolytisch angesteuert und so einer massenspektroskopischen Analyse zugeführt werden.

BELEGEXEMPLAR  
Darf nicht geliehen werden

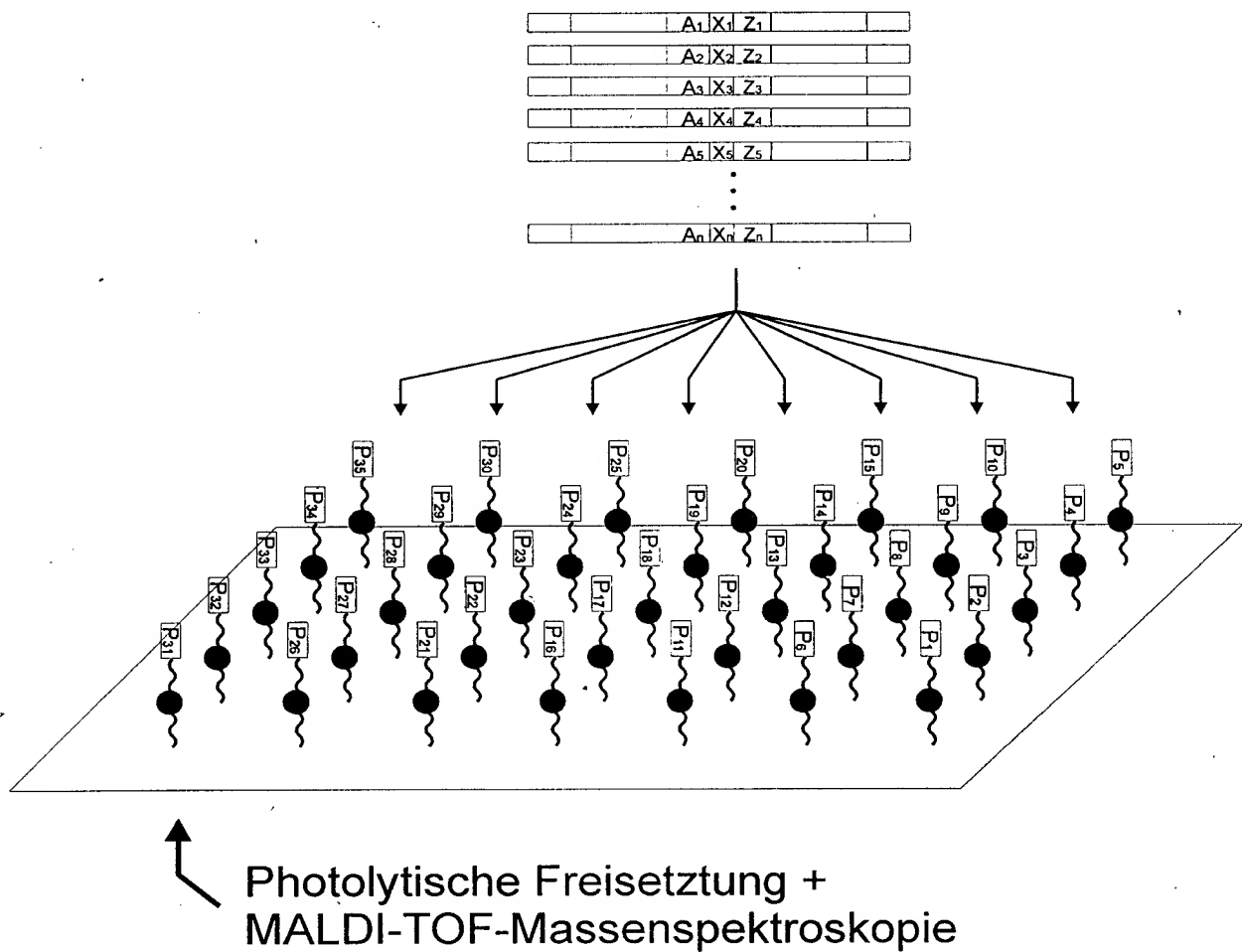
# Erklärende Abbildung zur Zusammenfassung



BELEG (EMPLAR)  
nicht verändert werden

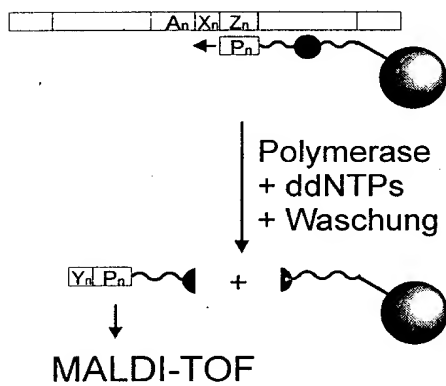
Figur 1

Multiplex-Analyse eines Nukleinsäure-Gemisches mit Hilfe eines photospaltbaren Oligonukleotid-Array

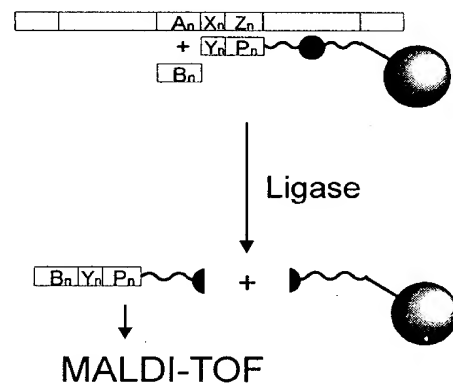


Figur 2 Massenspektroskopische Analyse  
nach Modifikation der Sonden

a) Primer-Verlängerung

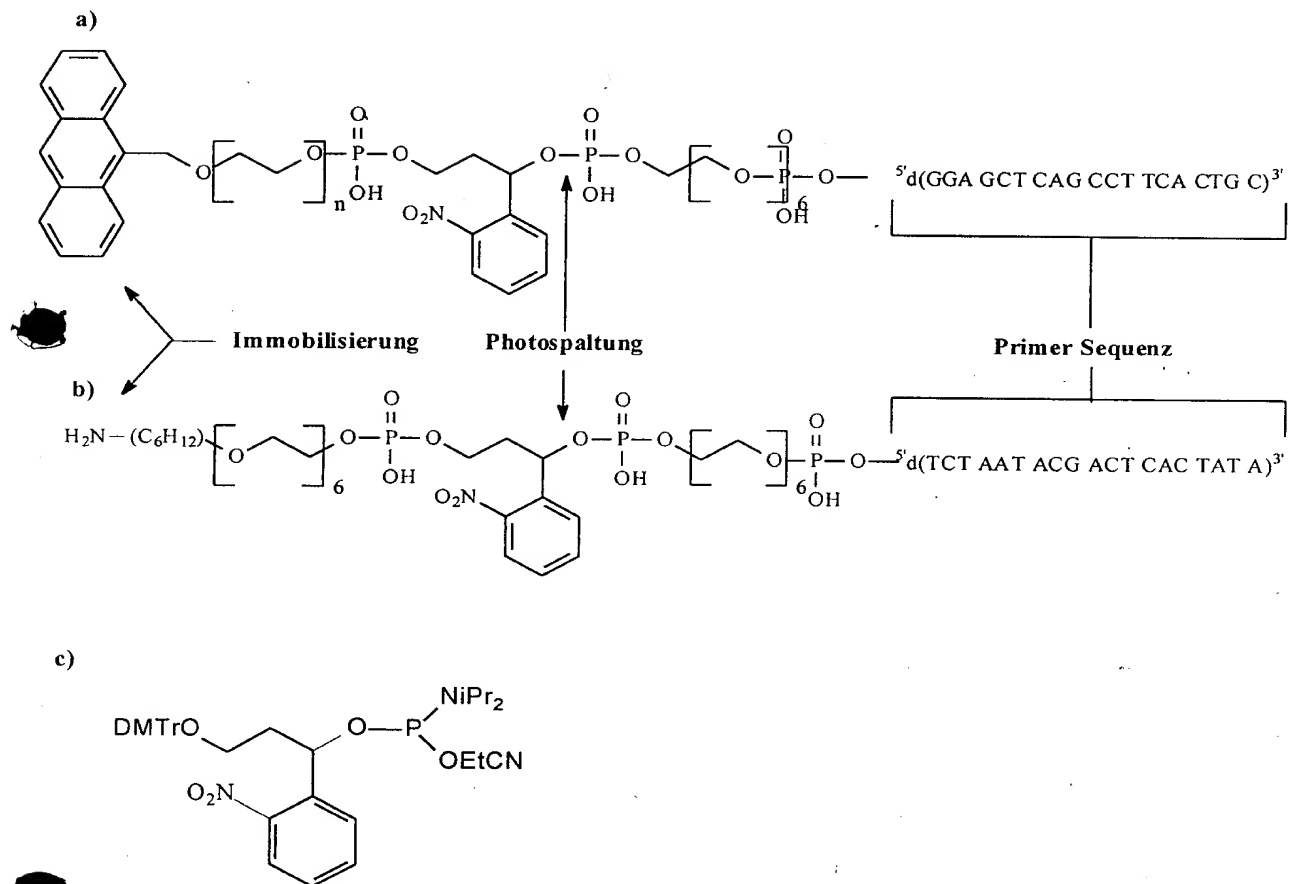


b) Templat-abhängige  
Ligation



BT-2000-AR  
Darf nicht geändert werden

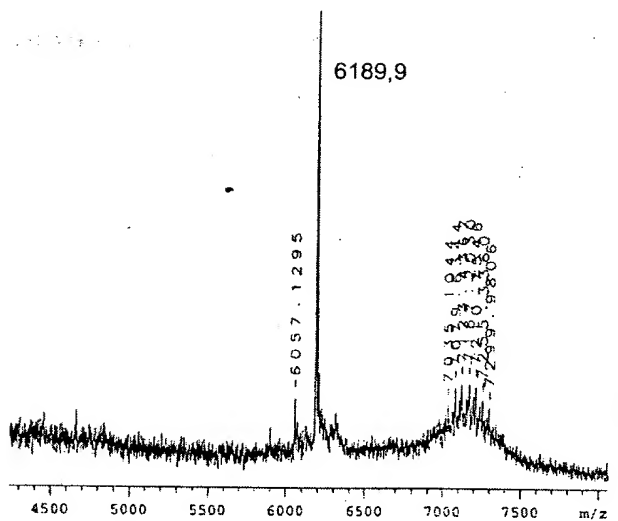
Figur 3 Design von photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden



Figur 4

BELEGEXEMPLAR  
Darf nicht geändert werden

a)



b)

[cpm]

